

アカフジツボの血球

近藤昌和^{1*}・友永 進²・高橋幸則¹Hemocyte of Balanomorph Barnacle, *Megabalanus rosa*Masakazu Kondo^{1*}, Susumu Tomonaga², and Yukinori Takahashi¹

Morphological features of the hemocyte in a balanomorph barnacle, *Megabalanus rosa*, were examined by light microscopy. A single type of the hemocyte, granulocyte, was observed in the hemolymph. This hemocyte was irregular in shape and characterized by both small granules ($<0.5 \mu\text{m}$ in diameter) and developing pseudopodia. The granules were not stained with May-Grünwald or hematoxylin-eosin. Nucleus was round or oval in shape. Lipofusutin-like granules were also observed, suggesting the phagocytic ability of the hemocyte. Hyaloplasm of the hemocyte was positive in DOPA reaction (Phenoloxidase (PO)- positive), but not the granules. The PO activity was also detected in the serum. Since small number of degenerated hemocytes were found in the coagulated hemolymph (gel), the PO in the serum may be originated from the hemocytes. However, the hemocyte and the melanin-pigment were not detected in the gel formed on wounded site of cirri. The total hemocyte count in the hemolymph was 0 to 4.2×10^3 cells/ml. Furthermore, the hemocyte-like cell with pseudopodia on the cell surface and locomotive activity was also observed on the parenchyma of cirrus. These results indicate that the hemocytes usually do not circulate in the hemolymph, but settle on the surface of tissues immersed in the hemolymph. Therefore, the hemocytes collected from the hemolymph in this study may detach from the tissue owing to the unknown reason, and the hemocytes do not participate in the coagulation of the hemolymph.

1 緒言

甲殻類の血球は主に軟甲亜綱十脚目(十脚甲殻類)における知見から、一般に3種類に分類されてきた¹⁻³⁾。しかし、この分類基準が、甲殻類全般に当てはまるか否かは明らかにされていない。我々は、これまでに下等甲殻類として鰓脚綱無甲目のブラインシュリンプ *Artemia salina*⁴⁾ と顎脚綱完胸上目有柄目のエボシガイ *Lepas anatifera*⁵⁾ の血球について報告した。これらの甲殻類は、いずれも1種類の血球(顆粒球)しか持たず、体液(血リンパ液)は体外でゲル化しなかった。

エボシガイと同じ完胸上目に属し、無柄目に分類されるフジツボ類の血球に関しては、*Balanus hameri*に2種類の血球(無顆粒細胞hyaline cellと小顆粒細胞semi-

granular cell)が報告されている⁶⁾。また、フジツボ類の血液(血リンパ)は体外で凝固することが知られている^{6,7)}。したがって、同じ分類群に属するエボシガイとフジツボ類の間に見られる血球の種類数と体液凝固反応様式の違いは、蔓脚類における生体防御機構の進化を反映しているものと推察される。しかし、*B. hameri* 血球は位相差顕微鏡で観察されておらず、無顆粒細胞に顆粒が全く存在しないのか、否かは不確実である。また、染色標本を観察しているにも関わらず、小顆粒細胞の顆粒の形態学的特徴についての記述がなく、エボシガイで観察された顆粒球との比較は困難であった。エボシガイの血球は体外で脱顆粒と細胞崩壊を起こすことから⁸⁾、*B. hameri*の無顆粒細胞は脱顆粒を起こした顆粒球である可能性がある。この点からもフジツボ類の血球や凝固反応について詳しい研究が必要であり、今回、アカフジツボ *Megabalanus rosa* 血球

2002年9月2日受付. Received Sep. 2. 2002.

1 水産大学校生物生産学科(Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagatohonmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

2 昇陽学院(Shouyou Gakuin Inc., Kiwanami, Ube, Yamaguchi 759-0207, Japan).

* 別刷り請求先(Corresponding author).

の形態を調べ確認できたのでここに報告する。

2 材料および方法

実験動物

山口県下関市吉見の海岸に漂着したプラスチック製の浮きに付着していたアカフジツボ *Megabalanus rosa* (殻径約3 cm) 約100個体を屋内の1,000l水槽に搬入した。流水条件下 (14~16°C) で1ヶ月以上予備飼育したのち、実験に供した。飼育期間中、餌としてクルマエビ用配合飼料 (エビアン、協和発酵) を粉碎して投与した。

血球観察

近藤ら⁵⁾ の報告にしたがって、固定液を予め入れた注射器を用いてフジツボの殻板と背板の間から注射針を挿入し、体液を採取した。この固定血球懸濁液をAuto Smear CF-12D (Sakura) で遠心し、ゼラチン処理したスライドガラスに血球を付着させて塗抹標本作製した。これにメイ・グリュンワルド (MG)、ヘマトキシリン・エオシン (HE) およびDOPA染色をそれぞれ施して光学顕微鏡で観察するとともに、位相差顕微鏡による観察も行った。また、アカフジツボの蔓脚部を切断し、位相差顕微鏡で観察した。

血球数の算出

MG染色標本上の全血球数を計測し、塗抹標本作製に用いた固定血球懸濁液の容量 (0.5ml) と体液の希釈率 (20倍) から換算して体液中の総血球濃度を求めた。

血液凝固反応

固定液を用いずに採取したアカフジツボ体液を25°Cで注射器中に静置し、血液凝固の有無を観察した。また、形成された凝固物の押し潰し標本を位相差顕微鏡で観察するとともに、同標本にMG染色を施して光学顕微鏡で観察した。

フェノールオキシダーゼ (PO) 活性の測定

固定液を用いずに採取した体液を25°Cで1時間静置した。遠心分離により得られた上清 (以後、血清と称す) 中のPO活性を、近藤ら⁵⁾ の報告にしたがって測定した。

損傷部位におけるメラニン形成の有無

蔓脚先端を切除し、切断面への血球の集合と、POによ

る反応産物であるメラニン色素形成の有無を調べた。

3 結果

体液 (血リンパ液) 中には1種類の血球のみが観察された (Fig. 1, Table 1)。血球は不定形であり、細胞質突起 (偽足) を有していた。血球の細胞質には顆粒が観察された (Fig. 1a)。顆粒は円形 (直径約0.5 μm) であり、MG染色に染まらず難染性であった (Fig. 1b)。顆粒はHE染色にも染まらなかった (Fig. 1d)。細胞質基質はMG染色で淡青色を、HE染色では淡橙色を呈した。核は円形または楕円形であり、核の長径は6.0~8.0 μm 、短径は4.5~6.0 μm であり、粒子状の濃縮クロマチンが核内に散在していた。また、核小体を核内に持つ血球も認められたが、核小体は細胞核あたり1個であった。DOPA染色では、細胞質基質が弱陽性であり、顆粒状の陽性部位は認められなかった (Fig. 1e)。また、リポフスチン様の褐色顆粒を持つ血球も観察された (Fig. 1c)。

体液中の総血球数 (濃度) は $0 \sim 4.2 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ ($n=20$ 、平均 $9.1 \times 10^2 \text{ cells/ml}$) であり、血球が全く見られない個体も存在した。固定液を用いずに採血したところ、採血直後のフジツボ体液は無色透明であった。しかし、時間の経過に伴って不透明になり、採血1時間後には、ゲルの形成が観察された (Fig. 2a)。ゲルは非常に柔らかく、繊維構造と微細な粒子状構造物が観察された (Fig. 2b)。ゲルはMG染色により、淡青色に染まった。また、ゲル内に血球の核と思われるものも認められた (Fig. 2c)。しかし、血球同士の凝集像は観察されなかった。

血清中にPO活性が検出された。吸光度は、血清のみでは0.000~0.006と低かったが、基質液を添加した血清では0.135~0.183と高い値を示し、PO活性値は平均0.155 ($n=10$) であった。

蔓脚切断面には凝固塊が形成された。しかし、血球の集積やメラニン色素の形成は認められなかった。

蔓脚の実質組織に付着した細胞が観察された。この細胞は偽足を有し、運動能を示した (Fig. 3)。

4 考察

甲殻類血球の分類は、主に軟甲亜綱十脚目で行われており、血球内顆粒の有無、数および大きさなどに基づいて一般に3種類に分類されている¹⁻³⁾。一方、原始的な甲殻類と考えられる鰓脚類 (ブラインシュリンプ)、および顎脚

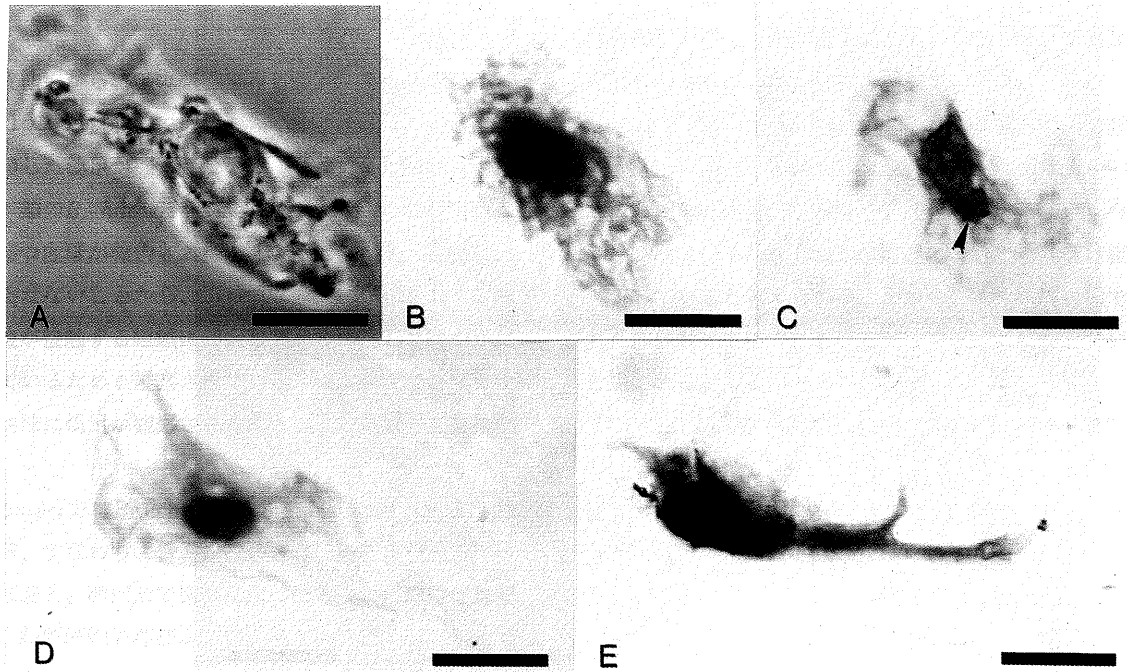


Fig. 1. Hemocytes of *Megabalanus rosa*. (A), Phase contrast microscopy. Note cytoplasmic granules and pseudopodia. (B), May-Grünwald stain. Granules show chromophobic. (C), May-Grünwald stain. Lipofusutin-like granules (arrowhead) in hemocyte. (D), Hematoxylin-eosin stain. Granules were not stained. (E), DOPA reaction (phenoloxidase detection). Activity was positive in hyaloplasm, but not in granules. Bars=10 μ m.

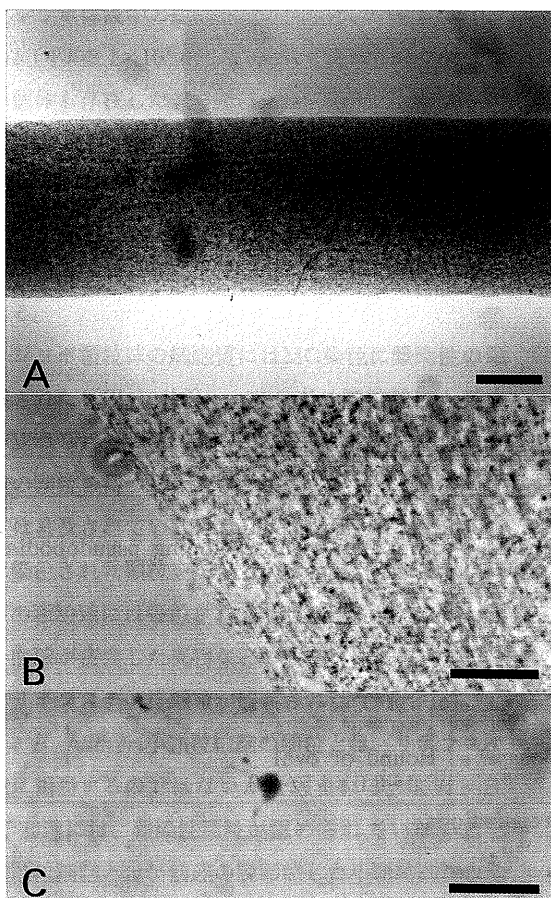


Fig. 2. Coagulated hemolymph of *Megabalanus rosa*. (A), Formed gel in syringe. Bar=2 mm. (B) Phase contrast microscopy of crushed gel. Note fiber and fine granules. Bar=10 μ m. (C) May-Grünwald stain of crushed gel. Note the nucleus of degenerated hemocyte. Gel was weakly basophilic. Bar=10 μ m.

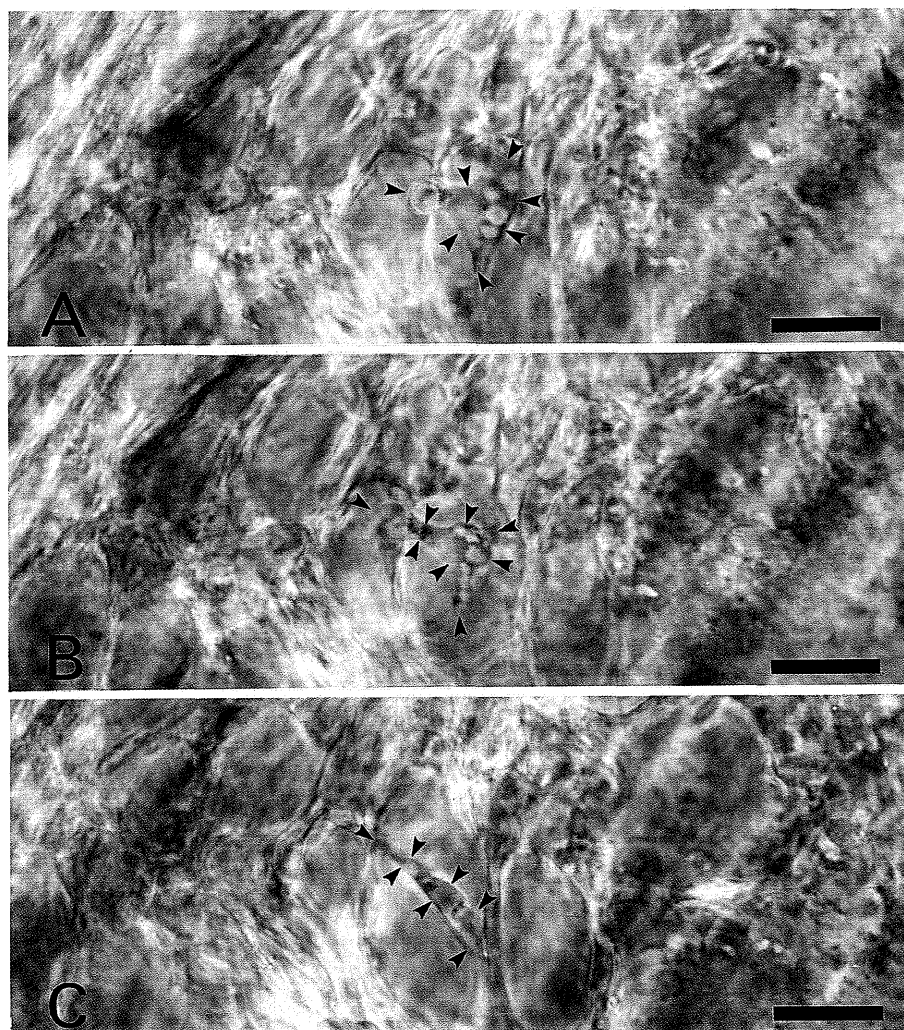


Fig. 3. Phase contrast microscopy of hemocyte-like cell (surrounded by arrowheads) on the parenchyma of cirrus of *Megabalanus rosa*. (A), 0 min. (B), 5 min. (C), 20 min. Note the transformation of pseudopodia and movement of the cell. Bars=20 μ m.

Table 1. Comparison of morphological features of hemocytes from *Lepas anatifera* and *Megabalanus rosa*.

	<i>L. anatifera</i> *	<i>M. rosa</i>
Cell shape	Round or oval with numerous filopodia	Irregular with developing pseudopodia
size (μ m)*	4.9~16.2 \times 4.8~11.9	
Granule staining	Chromophobic	Chromophobic
shape	Round	Round
size (diameter)	<0.5 μ m	<0.5 μ m
Nucleus shape	Irregular (round, oval, kidney, or V-shape)	Round or oval
size (μ m)*	4.3~8.1 \times 2.7~5.4	6.0~8.0 \times 4.5~6.0

Observation was occurred on May-Grünwald staining preparations.

* Length \times width.

* Kondo *et al.* (2002)⁵⁾.

類のエボシガイには1種類の血球のみを持つことが報告されている^{4,5)}。

本研究結果から、アカフジツボにおいても1種類の血球(顆粒球)のみが観察された(Fig. 1)。血球は不定形であり、発達した偽足が観察された。これまで、甲殻類では、フジツボ類の*B. hameri*⁶⁾とエボシガイ⁵⁾にのみ明瞭な偽足を持つ血球が報告されている(Table 1)。蔓脚類は心臓を持たないことから、恒常的な血液循環が乏しく、血球は体液が接触する組織に細胞質突起を伸長して緩やかに結合しているためと推察されている⁵⁾。本研究で、アカフジツボ血球に偽足が観察されたことは、この考えを支持している。

*B. hameri*ではBauchauの分類基準¹⁾に相当する2種類の血球、すなわち、普通に観察され、細胞質突起を持つ無顆粒細胞と、卵円形で様々な形の核と少数の顆粒性物質を持つ小顆粒細胞の存在が報告されている⁶⁾。*B. hameri*の血球観察には、固定液を用いずに採取した血液の塗抹標本が用いられている⁶⁾。したがって、*B. hameri*の無顆粒細胞は、採血時に脱顆粒を起こした小顆粒細胞と考えられる。体外における顆粒球の脱顆粒現象は、エボシガイにも認められている⁵⁾。

アカフジツボ体液中の総血球数(濃度)は $0\sim 4.2\times 10^3$ cells/ml(平均 9.1×10^2 cells/ml)であり、全く血球を持たない個体も存在した。また、体外で凝固したアカフジツボ血液中に血球の核と思われる構造物が観察された(Fig. 2C)。一方、*B. hameri*の体液凝固物中には血球は観察されていない⁶⁾。したがって、Waite and Walkerは⁶⁾、血球を持っていない*B. hameri*を実験に使用したと推察される。

アカフジツボ顆粒球の細胞質にはMG染色に難染性の顆粒が観察された(Fig. 1b)。エボシガイ顆粒球にも難染性顆粒が認められている⁵⁾。一方、*B. hameri*の小顆粒細胞は少数の顆粒を持つと報告されているが⁶⁾、その染色性については言及されていない。しかし、示された図から、顆粒とは染色された顆粒を指していると考えられる。アカフジツボの顆粒球には染色される顆粒は観察されなかった。しかし、血球が貪食した異物などの残渣小体に相当すると思われるリポフスチン様顆粒が観察された(Fig. 1c)。したがって、*B. hameri*小顆粒細胞の顆粒とは、リポフスチン様顆粒に相当するのではないかと思われる。また、*B. hameri*の血球には、難染性顆粒が認められていないことから、無顆粒細胞とは、前述の脱顆粒した小顆粒細胞の他に、難染性顆粒を持った血球である可能性も考えられる。

この意味で、*B. hameri*の小顆粒細胞とは、無顆粒細胞と同じ種類の血球が異物貪食の結果、リポフスチン様顆粒を有していたものと考えられる。

アカフジツボ血液中の総血球数(濃度)は平均 9.1×10^2 cells/mlであり、エボシガイでは $1.6\sim 14\times 10^5$ cells/ml⁵⁾、*B. hameri*では 2.5×10^3 cells/mlと報告されている⁶⁾。しかし、前述のように、血球は組織に付着していると考えられることから、これら蔓脚類で得られた血球数は生体内における実数を正確に反映していないと思われる。

POは節足動物で特に発達した生体防御を担う酵素であり、甲殻類では十脚目で詳細に調べられている⁸⁾。しかし、PO活性の存在部位は顆粒、顆粒と細胞質、小胞、細胞質基質と様々である(文献4, 5を参照)。本研究から、アカフジツボの血清中にPO活性が検出され、また、血球の細胞質基質中にも酵素反応が認められた(Fig. 1d)。したがって、血清中のPO活性は、採血時に崩壊した血球由来のものと考えられる。アカフジツボ類と同様に、エボシガイの体液にもPO活性が検出されており、血球の細胞質基質中に酵素反応が認められている⁵⁾。

アカフジツボの蔓脚切断部位には、体液凝固塊(ゲル)が形成されたが、血球は観察されなかったことから、血液凝固には血球は関与しないと考えられる。エボシガイの体液は体外で血球の脱顆粒と崩壊が起こり、引き続いて、原始的な体液凝固反応物と考えられる顆粒状物質が形成され、それが連鎖状、網目状および塊状に集合することが報告されている⁵⁾。したがって、エボシガイの顆粒状物質形成には血球が関与すると推察されている⁵⁾。本研究結果から、血球様の細胞がアカフジツボ蔓脚の実質組織に付着しているのが観察された(Fig. 3)。このことは、血球が通常、血液の触れる臓器に付着しており、循環血液中には存在しないことを示している。したがって、エボシガイで観察された顆粒状物質形成にも血球は関与していないと推察される。寄生性蔓脚類(現在では、顎脚綱根頭亜綱に分類されている)であるフクロムシの1種*Sacculina carcina*では、血球が存在しないにも関わらず、体液がゲル化することが報告されている⁹⁾。以上のことから、蔓脚類の体液凝固には血球は関与しないと考えられる。十脚甲殻類では、血球から放出されたトランスグルタミナーゼが血漿中の凝固タンパク質を架橋してゲル化を引き起こすことが知られている⁸⁾。したがって、蔓脚類の体液凝固に血球が関与していないことが事実であるならば、十脚甲殻類と蔓脚類の血液凝固反応は大きく異なるといえる。

アカフジツボの蔓脚切断部位には、メラニン色素形成は観察されなかった。ブラインシュリンプでは損傷部位に血球が集積し、ついでメラニン色素が形成される⁴⁾。アカフジツボの蔓脚切断部位には血球が集積しなかったことが、メラニン色素形成が起らなかった原因と考えられる。エボシガイにおいても柄部切断部位にメラニン色素の形成は観察されておらず⁵⁾、その原因として、血液中の基質濃度との関連が示唆されている⁶⁾。しかし、エボシガイでもアカフジツボと同様に、損傷部位に血球集積が起こっていない可能性があり、再試験する必要がある。

文 献

- 1) A. G. Bauchau: Crustaceans, in *Invertebrate Blood Cells* (ed. by N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley), Vol. 2, Academic Press, New York, 1981, 386-420.
- 2) G. G. Martin and J. E. Hose: Vascular Elements and Blood (Hemolymph), in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Vol. 10, Wiley-Liss, New York, 1992, 117-146.
- 3) M. W. Johansson, P. Keyser, K. Sritunyalucksana and K. Söderhäll: Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, **191**, 45-52 (2000).
- 4) 近藤昌和, 高橋幸則, 友永 進: ブラインシュリンプの血球. 水大校研報, **50**, 141-150 (2002).
- 5) 近藤昌和, 友永 進, 高橋幸則: エボシガイの血球. 水大校研報, **50**, 67-73 (2002).
- 6) M. E. Waite and G. Walker: The haemocytes of balanomorph barnacles. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **68**, 391-397 (1988).
- 7) R. T. Fitzgerald: Calcium and pH dependency in the clotting of the blood of *Balanus nubilus* (Darwin, 1854). *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 1055-1059 (1968).
- 8) K. Sritunyalucksana and K. Söderhäll: The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, **191**, 53-69 (2000).
- 9) W. H. Barker Jr. and F. B. Bang: The effect of infection by gram-negative bacteria, and their endotoxins, on the blood-clotting mechanism of the crustacean *Sacculina carcini*, a parasite of the crab *Carcinus maenas*. *J. Invertebr. Pathol.*, **8**, 88-97 (1966).